

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 27 日 (27.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/024486 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/22, A61P 19/10 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/09504
- (22) 国際出願日: 2002 年 9 月 17 日 (17.09.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-281108 2001 年 9 月 17 日 (17.09.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野田 政樹 (NODA, Masaki) [JP/JP]; 〒150-0022 東京都渋谷区恵比寿南 3-1 1-1 7-6 0 7 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR BONE LOSS

(54) 発明の名称: 骨量減少症治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide remedies for whereby spongiosa can be increased without causing cortical bone loss induced by the administration of PTH in treating bone loss. By administering PTH while inhibiting the effect of osteopontin *in vivo*, not only spongiosa but also cortical bone can be increased.

(57) 要約:

本発明の目的は、骨量減少症を治療するうえで、PTH 投与により誘導される皮質骨の喪失を伴わずに海綿骨骨量を増加させる治療剤を提供することである。

生体内でのオステオポンチンの作用を阻害しながら PTH を投与することにより、海綿骨骨量だけでなく、皮質骨骨量も増加させることができる。

明細書
骨量減少症治療剤

技術分野

- 5 本発明は、生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を含有する、骨量減少症治療剤、骨形成促進剤及び皮質骨骨量増加剤に関する。

10 背景技術

- オステオポンチン（OPN）はシアル酸を多く含有し、RGD配列を有する糖タンパク質である。破骨細胞の clear zone に接する部位に局在し、インテグリン、特に $\alpha v \beta 3$ インテグリンとの結合を介して骨基質への接着に関与する。また、骨芽細胞にも存在する。Yoshitake ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8156-8160 (1999) には、OPNノックアウトマウスにおいて、卵巣切除により誘導される骨吸収が軽減されたことが記載されている。

- 副甲状腺ホルモン（PTH）は副甲状腺より分泌されるアミノ酸84個から成る直鎖のポリペプチドで、骨と腎臓に作用し、血中のカルシウム濃度を調節している。PTHは骨芽細胞系細胞に作用してGM-CSF、M-CSFなどのサイトカイン産生を促進し、破骨細胞の形成を促進することによって、骨吸収を亢進するが、骨形成も促進することが知られている。例えば、Reeve らは閉経後骨粗鬆症患者に6ヶ月間、 $100 \mu\text{g/day}$ のPTH（1-34）を連日皮下投与した結果、カルシウムバランスが正常化し、海綿骨骨量が増加したことを報告している。さらに高用量（ $200 \mu\text{g}$ ）投与では骨形成も骨吸収も刺激されるのに対して、低用量（ $100 \mu\text{g}$ ）ではカルシウムバランスを是正し、骨形成を増加させたとしている。さらに彼らは7施設、計21人の骨粗鬆症患者に対し、6～24ヶ月間のPTH連日皮下投与を実施した。患者背景が均一でないため結果は多様であったが、カルシウムバランスは改善せず、海綿骨骨量は増加し、皮質骨骨量は低下していた（Reeve ら、Br Med J 280: 1340-1344 (1980)）。このように、

P T Hは海綿骨の骨量は増加させるが、皮質骨については骨量を減少させる作用があることが知られている。一方で、骨量減少症治療の臨床結果を判断する上で重要な骨折頻度抑制には、海綿骨のみならず皮質骨の骨量を増加させることが重要であると考えられている。

5

発明の開示

骨量減少症の治療は骨折頻度抑制を目的としている。骨強度を増加させ、骨折頻度を軽減させるためには海綿骨のみならず皮質骨の骨量を増加させることが重要である。しかしながら、P T H投与による海綿骨骨量の増加には皮質骨骨量の喪失が伴うという問題があった。

10

そこで、本発明者は、上記問題を解決するため、P T H投与による骨量の増加方法について種々の検討を行った。その結果、生体内でのO P Nの作用を阻害した動物モデルにP T Hを投与することによって、海綿骨骨量を増加させるとともに、皮質骨骨量も増加させることができることを見出した。本発明はこの知見に基づき完成したものである。

15

したがって、本発明は、海綿骨だけでなく皮質骨の骨量も増加させる理想的な骨量減少症治療剤を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（P T H）、P T H誘導体及びP T H受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を含有する骨量減少症治療剤を提供する。

20

また、本発明は、生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（P T H）、P T H誘導体及びP T H受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を含有する骨形成促進剤を提供する。

更に、本発明は、生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（P T H）、P T H誘導体及びP T H受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を含有する皮質骨骨量増加剤を提供する。

25

図面の簡単な説明

図1は、ヒトPTH（1-34）の投与による、野生型（WT）マウス及びOPNノックアウト（OPN-KO）マウスにおける海綿骨骨量（BV/TV）の変化を表したグラフである。

図2は、ヒトPTH（1-34）の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける皮質骨の変化を表したグラフである。Aは皮質骨の厚さを、Bは皮質骨の面積を示す。

図3は、ヒトPTH（1-34）の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける大腿骨骨幹中央の皮質骨形成の変化を表したグラフである。Aは骨膜の骨形成率（BFR）、Bは骨膜の石灰化速度（MAR）、Cは骨内膜のBFR、Dは骨内膜のMARを示す。

図4は、ヒトPTH（1-34）の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける大腿骨遠位端の海綿骨形成の変化を表したグラフである。AはBFR、BはMARを示す。

図5は、ヒトPTH（1-34）の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける海綿骨の単位骨梁周囲長当たりの破骨細胞数の変化を表したグラフである。

図6は、ヒトPTH（1-34）の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける尿中デオキシピリジノリン（Dpyr）レベルの変化を表したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の骨量減少症治療剤は、生体内でのオステオポンチン（OPN）の作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を含有する。PTHによる骨折頻度抑制作用を高めるためには、海綿骨骨量を増加させるとともに、皮質骨骨量も増加させることが必要であり、このためには、実施例で後述するとおり、生体内でのOPNの作用を阻害することが必要である。

実施例から明らかなように、OPNを欠損させても破骨細胞数や全身の骨代謝

に変化はみられない。一方、データは示していないが、OPN欠損型マウスでは、野生型マウスと比較して、骨芽細胞の分化が促進される。すなわち、OPNは破骨細胞ではなく、骨芽細胞系列の細胞に影響を与えているものと思われる。さらに、OPNは、PTH投与による骨代謝回転において負のフィードバック制御を行っていると考えられる。

したがって、本発明の骨量減少症治療剤にはPTH、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質に加えて、生体内でのOPNの作用を阻害する物質を含有する。

生体内でのOPNの作用を阻害する物質としては、OPNの潜在的なアンタゴニストが挙げられる。潜在的なアンタゴニストは、OPN及び／又はその受容体であるインテグリン、好ましくは $\alpha v \beta 3$ インテグリンのポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドと結合し、それによりその活性又は発現を阻害又は消滅させる小型有機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体及び低分子化合物を包含する。

例えば、潜在的なアンタゴニストは、OPN及び／又はその受容体であるインテグリン、好ましくは $\alpha v \beta 3$ インテグリンのポリペプチドの結合部位に結合してその部位を占領し、それによりOPNと受容体との結合を妨害して、正常な生物学的活性を防御する小型分子を包含する。小型分子の例は、小型有機分子、ペプチド、ペプチド様分子、低分子化合物を包含するが、これらに限定するものではない。 $\alpha v \beta 3$ インテグリンに結合するアンタゴニストの具体例としては、RGDペプチド様化合物であるSC65811 (WO97/08145号) などが挙げられる。

その他の潜在的なアンタゴニストはアンチセンス分子を包含する（これらの分子についての記載に関しては、Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988) を参照。）。

潜在的アンタゴニストは、OPNに関連する化合物及びその変種を包含する。

OPNの潜在的アンタゴニストとして抗オステオポンチン抗体を用いる場合は、OPNのRGD配列を認識する抗体が好ましい。本発明の方法に使用される抗体は、所望の抗原と結合する限り特に制限はなく、マウス抗体、ラット抗体、ウサ

- ギ抗体、ヒツジ抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体、ヒト抗体等を適宜用いることができる。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、均質な抗体を安定に生産できる点でモノクローナル抗体が好ましい。
- ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は当業者に周知の方法により作製することができる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原や所望の抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングすることによって作製できる。ハイブリドーマの作製は、たとえば、ミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 73: 3-46 (1981)）等に準じて行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させて免疫を行えばよい。
- また、発現ブロッキング法を用いてOPN及び／又はその受容体をコードしている遺伝子の発現を阻害することができる。このブロッキングは遺伝子発現のいずれの工程を標的としてもよいが、好ましくは、転写及び／又は翻訳を標的とする。この種の既知方法の例は、体内で生じるか又は別個に投与されるアンチセンス配列の使用を包含する（例えば、Okano, J. *Neurochem.* 56: 560 (1991)；
- OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)）。別法として、遺伝子とともに三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを提供してもよい（例えば、Lee ら、*Nucleic Acids Res* 6: 3073 (1979)；Cooney ら、*Science* 241: 456 (1988)；Dervan ら、*Science* 251: 1360 (1991)）。これらのオリゴマーはそれ自体投与することができ、あるいは重要部分のオリゴマーをインビボで発現させることもできる。

本発明の骨量減少症治療剤には、副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質が含まれる。

「副甲状腺ホルモン（PTH）」には、天然型のPTH、遺伝子工学的手法で製造された組換えPTH、化学的に合成されたPTHが包含され、好ましい例と

しては、84アミノ酸残基より成るヒトPTH（ヒトPTH（1-84））、特に遺伝子工学的手法で製造された組換えヒトPTH（1-84）が挙げられる。

「PTH誘導体」には、骨形成を刺激し、そして骨量を増加させることのできるPTHフラグメント又は代謝産物、及びそれらの構造類似物が包含される。また、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、副甲状腺ホルモン関連ペプチドの活性フラグメント及び副甲状腺ホルモン関連ペプチドの類似物（WO 94/01460号）も含まれる。骨形成刺激活性及び骨量増加活性は、標準的アッセイに従って、当業者により容易に決定することができる（Eriksen E. F. ら、Bone Histomorphometry, Raven Press, New York, 1994, pp. 1-74; Grier S. J. ら、The Use of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry In Animals, Inv. Radiol., 1996, 31(1), pp. 50-62; Wahner H. W. 及び Fogelman I., The Evaluation of Osteoporosis: Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Clinical Practice., Martin Dunitz Ltd., London, 1994, pp. 1-296）。多様なPTH誘導体が文献に記載されており、当業者に利用可能である。また、当業者には、その他のPTH誘導体も公知になるであろう。典型的なPTH誘導体が、以下の参考文献中に開示されている（"Human Parathyroid Peptide Treatment of Vertebral Osteoporosis", Osteoporosis Int. 3 (Supp-1), 199-203; "PTH 1-34 Treatment of Osteoporosis with Added Hormone Replacement Therapy: Biochemical, Kinetic and Histological Responses", Osteoporosis Int. 1, 162-170）。また、PTH誘導体には、PTHフラグメントや、PTHそのものあるいはそのフラグメントの構成アミノ酸を一部他のアミノ酸に置換したペプチド、PTHそのものあるいはその部分ペプチドの構成アミノ酸の一部を欠失したペプチド、及びPTHそのものあるいはその部分ペプチドに1種以上のアミノ酸を付加したペプチドなどで同様の活性を有するすべてのペプチドが含まれる。ここで、アミノ酸の置換、欠失又は付加とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の方法により置換、欠失又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されることを意味する。好ましいPTHフラグメントとしては、ヒトPTH（1-34）、ヒトPTH（1-64）、ヒトPTH（35-84）、ウシPTH（1-34）などが挙げられるがこれらには限定されない。「PTH（1-3

4) 」とは、PTHのN末端から34番目までの34個のアミノ酸から成るPTHの部分ペプチドを示す。更に好ましいPTHフラグメントとしては、アミノ酸34残基より成るヒトPTH（ヒトPTH（1-34））、特に遺伝子工学的手法で製造された組換えヒトPTH（1-34）が挙げられる。また、アミノ酸置換の好ましい例としては、8番目の構成アミノ酸のロイシンやノルロイシンへの置換、18番目の構成アミノ酸のロイシンやノルロイシンへの置換、34番目の構成アミノ酸のチロシンへの置換などが挙げられる。

本発明の骨量減少症治療剤を用いることにより、海綿骨骨量だけでなく、皮質骨骨量も増加させることができる。また、海綿骨や皮質骨（特に骨膜領域）において、骨形成率や石灰化速度を上昇させることが可能である。

本発明の治療剤を用いることができる骨量減少症は、例えば、骨粗鬆症等の疾患によって引き起こされる。

本発明の治療剤は、1種もしくはそれ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩衝剤、結合剤、安定剤等を含む薬学的組成物として、目的とする投与経路に応じ、適当な任意の形態にして投与することができる。投与経路は非経口的経路であっても経口的経路であってもよい。

本発明の治療剤の有効成分の投与量は、患者の体型、年齢、体重、疾患の度合い、発症後の経過時間等により、適宜選択することができるが、例えば、経口投与及びその他の非侵襲経路による投与の場合には、一般に0.01~1,000 mg/day/personの用量で使用され、筋注及び皮下注による非経口投与の場合には0.001~1,000 mg/day/personの用量で使用され、静注による非経口投与の場合には0.0001~1,000 mg/day/personの用量で使用される。有効成分としてPTH（1-34）を使用する場合は、筋注及び皮下注による非経口投与の場合には0.01~100 mg/day/person、好ましくは20~40 µg/day/personの用量が好ましい。静注による非経口投与の場合には0.001~100 mg/day/person、好ましくは2 µg/day/personの用量が好ましい。経口投与及びその他の非侵襲経路による投与の場合には0.1~100 mg/day/personの用量が好ましい。

上記記載は本発明の骨形成促進剤及び皮質骨骨量増加剤についても同様にあてはまる。

本発明の骨量減少症治療用キットは、（a）生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、（b）骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質、並びに（c）使用説明書、を含む。

実施例

以下の実験例及び比較例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

実施例及び比較例において行った解析方法を以下に示す。

海綿骨骨量の測定

大腿骨骨幹端領域について矢状断面の切片を作製し、X線マイクロ断層撮影装置Musashi (Nittetsu-ELEX, Osaka, Japan) を用いて断層像を得た。次に、Luzex-F自動画像解析システム (Nireco, Tokyo, Japan) を用いて、骨遠位端の成長板から0.2 mm離れたところに位置する、1.47 mm² (0.7 × 2.1 mm) の四角面積内の画像データを解析してBV/TV値を得た。

BV/TV (bone volume/total tissue volume) は、単位骨量(%)、すなわち、組織全体の体積に占める骨梁全体の体積を表す。したがって、BV/TVの増加は石灰化した骨が増加したことを意味する。

皮質骨の厚さ及び面積の測定

大腿骨骨幹中央について水平断面の切片を作製し、X線マイクロ断層撮影装置Musashi (Nittetsu-ELEX, Osaka, Japan) を用いて断層像を得た。次に、Luzex-F自動画像解析システム (Nireco, Tokyo, Japan) を用いて、画像データを解析し、皮質骨の厚さ及び面積を測定した。厚さは、45°ごとに8点で測定した値の平均値により評価した。

骨形成率 (BFR) 及び石灰化速度 (MAR) の測定

皮質骨については、大腿骨骨幹中央について水平断面の脱灰切片（厚さ $3\text{ }\mu\text{m}$ の連続切片）を調製し、骨膜及び骨内膜領域におけるBFR及びMARを調べた。具体的には、検体採取前9日及び2日に、カルシウムキレート作用を有するカル
5 セイン（ 4 mg/kg 体重）を皮下投与し、標識された2本のバンドの間隔を蛍光顕微鏡で測定することによりBFR及びMARを算出した。

BFRは、単位骨梁面当たりの骨形成速度（ $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ ）を表す。

MARは、標識された石灰化面間の距離の増加率（ $\mu\text{m}/\text{day}$ ）を表す。

海綿骨については、骨幹端領域の脱灰矢状切片を調製し、骨遠位端の成長板か
10 ら0.2mm離れた1.4mm²の四角面積内のBFR及びMARを調べた。標識は、検体採取前4日にキシレノールオレンジ（ 100 mg/kg 体重）を、2日前にカルセインを皮下投与することにより行った。

TRAP陽性細胞（破骨細胞）の測定

PTH投与後、前肢の骨を切り出した。骨をPBSでリンスし、4%パラホルムアルデヒド酸で7日間固定後、10%EDTA（pH7.4）で3日間カルシウム除去を行った。次に、脱水してパラフィンに包埋した。パラフィンプロック
15 から厚さ $7\text{ }\mu\text{m}$ の連続切片を調製し、染色してTRAP（tartrate resistant acid phosphatase）活性を測定した。対比染色はアルシアンブルーを用いて行った。各骨から得た厚さ $7\text{ }\mu\text{m}$ の連続切片15枚を用いて、海綿骨に付着した3つ
20 以上の核を有するTRAP陽性細胞を数えた。各15切片は、1本の骨当たり合計75切片を切り出し、5切片毎にとったものである。15切片すべてのTRAP陽性細胞数を合計し、そして単位骨梁周囲長当たりの破骨細胞数を得た。

尿中デオキシピリジノリン解析

PTH投与26日後に、各マウスから24時間以内の尿サンプル（各群10サンプル）を回収した。骨代謝マーカーとして、尿中デオキシピリジノリン（Dpyr）レベルをELISAキット（Metra Biosystems, San Diego, CA）を用いて製造者のプロトコルにしたがい測定した。

統計解析

データは全て平均±標準誤差として示し、統計的有意差は Fisher 検定を用いて評価した。

5

実施例 1

生体内での OPN の作用を阻害した動物モデルとして、7 週齢の 129 系雌マウスについて OPN 遺伝子を欠損させたノックアウトマウス (OPN-KO マウス) を Rittling ら、J. Bone Miner. Res., 13: 1101-1111, 1998 に記載のごとく作製し、これを用いて PTH 投与試験を 1 回行った。各群 6 匹のマウスを用いた。

組換えヒト PTH (1-34) (Bachem, Torrance, CA) を、0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma Chemical Co.-Aldrich, St. Louis, MO) を含む酸性化生理食塩水に溶解した。OPN-KO マウスに、 $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重のヒト PTH (1-34) を、1 週間に 5 日間、4 週間にわたって皮下投与した。対照群には生理食塩水のみを投与した。

OPN 作用を欠損させたマウスにおける骨代謝に対する PTH の効果について以下のように試験した。

(1) 海綿骨骨量

図 1 は、ヒト PTH (1-34) の投与による、WT マウス及び OPN-KO マウスにおける海綿骨骨量 (%) の変化を表したグラフである。図 1 に示すように、OPN-KO マウスにおける生理食塩水投与群 (PTH (-) 群) の BV/TV は $13.45 \pm 2.88\%$ であったのに対し、PTH 投与群 (PTH (+) 群) の BV/TV は $24.41 \pm 2.85\%$ であった。PTH 投与により OPN-KO マウスの海綿骨骨量は有意 ($p < 0.05$) に増加した。

(2) 皮質骨の厚さ及び面積

図 2 A は、ヒト PTH (1-34) の投与による、WT マウス及び OPN-KO マウスにおける皮質骨の厚さ (mm) の変化を表したグラフである。OPN-KO マウスでは、PTH (-) 群の皮質骨の厚さは $0.20 \pm 0.02 \text{ mm}$ で

あったのに対し、PTH (+) 群の厚さは 0.26 ± 0.04 mm に増加し、その差は有意であった ($p < 0.05$)。

図2Bは、ヒトPTH (1-34) の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける皮質骨の面積 (mm^2) の変化を表したグラフである。OPN-KOマウスでは、PTH (-) 群の皮質骨の面積は 0.69 ± 0.09 mm^2 であつたのに対し、PTH (+) 群の面積は 0.88 ± 0.13 mm^2 であり、PTH投与により皮質骨の面積は有意 ($p < 0.05$) に増加した。

(3) 皮質骨のBFR及びMAR

骨形成の機構について調べるため、大腿骨骨幹中央の皮質骨の骨膜及び骨内膜におけるBFR及びMARを測定した。図3は、ヒトPTH (1-34) の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける大腿骨骨幹中央の皮質骨形成の変化を表したグラフである。

骨膜においては、PTH (-) 群のBFR (図3A) は 1.29 ± 0.10 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図3B) は 2.44 ± 0.18 $\mu\text{m}/\text{day}$ であつたのに対し、PTH (+) 群のBFRは 2.38 ± 0.18 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MARは 2.97 ± 0.25 $\mu\text{m}/\text{day}$ であつた。PTH投与によりBFRは約1.8倍、MARは約1.2倍に増加し、その差はいずれも有意 ($p < 0.05$) であつた。

一方、骨内膜においては、PTH (-) 群のBFR (図3C) は 0.66 ± 0.10 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図3D) は 1.25 ± 0.20 $\mu\text{m}/\text{day}$ であつたのに対し、PTH (+) 群のBFRは 0.62 ± 0.09 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MARは 1.33 ± 0.28 $\mu\text{m}/\text{day}$ であつた。PTH投与による影響はほとんど認められなかった。

(4) 海綿骨のBFR及びMAR

海綿骨においても同様にBFR及びMARを測定した。図4は、ヒトPTH (1-34) の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける大腿骨遠位端の海綿骨形成の変化を表したグラフである。

PTH (-) 群のBFR (図4A) は 1.27 ± 0.08 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図4B) は 3.75 ± 0.23 $\mu\text{m}/\text{day}$ であつたのに対し、

PTH (+) 群のBFRは $2.68 \pm 0.34 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MARは $6.21 \pm 1.11 \mu\text{m}/\text{day}$ であった。PTH投与によりBFRは約2.1倍、MARは約1.7倍に増加し、その差はいずれも有意 ($p < 0.05$) であった。

5 (5) 破骨細胞数

図5は、ヒトPTH (1-34) の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける単位骨梁周囲長当たりの破骨細胞数の変化を表したグラフである。OPN-KOマウスの海綿骨の骨梁における単位領域当たりの破骨細胞数は、PTH (-) 群は 6.3 ± 0.9 個/mmであったのに対し、PTH (+) 群は
10 7.6 ± 1.0 個/mmに増加した。

(6) Dpyr尿中排泄

PTH投与による全身骨再吸収の変化を評価するために、マウス尿中のDpyrレベルを測定した。図6は、ヒトPTH (1-34) の投与による、WTマウス及びOPN-KOマウスにおける尿中Dpyrレベルの変化を表したグラフである。PTH (-) 群では $28.93 \pm 8.54 \text{ nM}/\text{mM Cr}$ であったの
15 に対し、PTH (+) 群では $34.67 \pm 4.52 \text{ nM}/\text{mM Cr}$ であった。PTH投与により全身の骨再吸収は約1.2倍に増加し、その差は有意 ($p < 0.05$) であった。

20 比較例 1

野生型の129系雌マウス (7週齢) を用いて、骨代謝に対するPTHの効果について実施例1と同様の方法で調べた。各群6匹のマウスを用いた。

(1) 海綿骨骨量

図1に示すようにPTH (-) 群のBV/TVは $13.14 \pm 2.27\%$ であったのに対し、PTH (+) 群のBV/TVは $21.17 \pm 2.68\%$ であ
25 った。

すでに報告されているとおり (Jilka ら、J. Clin. Invest. 第104巻: 439~446頁、1999年)、4週間のPTH投与によりWTマウスの海綿骨骨量は有意 ($p < 0.05$) に増加した。しかし、OPN-KOマウスとの間で

増加率に大差はなかった。

(2) 皮質骨の厚さ及び面積

PTH (−) 群の皮質骨の厚さは 0.18 ± 0.02 mm であり、PTH (+) 群の厚さは 0.20 ± 0.01 mm であった (図 2 A)。PTH の投与により、皮質骨の厚さはわずかに増加したものの大きな変化は認められなかった。

図 2 A に示すように、PTH (−) 群の皮質骨の厚さは、WT マウスと OPN − KO マウスとのあいだで大きな差が認められなかったのに対し、PTH (+) 群では、WT マウスと OPN − KO マウスのあいだで比較するとその差は有意であった ($p < 0.05$)。

PTH (−) 群の皮質骨の面積は 0.65 ± 0.07 mm² であり、PTH (+) 群の面積は 0.69 ± 0.03 mm² であった (図 2 B)。PTH の投与により、皮質骨の面積はやや増加したものの大きな変化は認められなかった。

図 2 B から明らかなように、PTH (−) 群の皮質骨の面積には WT マウスと OPN − KO マウスとのあいだで大きな差は認められなかった。一方、PTH を投与しても WT マウスでは皮質骨の面積がわずかしこ増加しなかったのに対し、OPN − KO マウスでは PTH 投与により皮質骨の面積が有意 ($p < 0.05$) に増加していた。PTH (+) 群の WT マウスと OPN − KO マウスとのあいだで皮質骨の面積を比較してもその差は有意 ($p < 0.05$) であった。

(3) 皮質骨の BFR 及び MAR

骨膜においては、PTH (−) 群の BFR (図 3 A) は 1.67 ± 0.08 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図 3 B) は 2.79 ± 0.15 $\mu\text{m}/\text{day}$ であったのに対し、PTH (+) 群の BFR は 1.07 ± 0.08 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR は 2.05 ± 0.21 $\mu\text{m}/\text{day}$ であった。PTH 投与により、骨膜の BFR は約 0.6 倍、MAR は約 0.7 倍になり、骨形成を有意 ($p < 0.05$) に抑制した。

骨内膜においては、PTH (−) 群の BFR (図 3 C) は 0.76 ± 0.11 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図 3 D) は 1.68 ± 0.18 $\mu\text{m}/\text{day}$ であったのに対し、PTH (+) 群の BFR は 1.37 ± 0.18 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR は 2.44 ± 0.29 $\mu\text{m}/\text{day}$ であった。骨膜とは逆

に、PTH投与により骨内膜のBFR及びMARが有意 ($p < 0.05$) に増加した (それぞれ約1.8倍及び約1.5倍)。

したがって、OPNの欠損により、PTHによる皮質骨の骨形成抑制効果がブロックされ、PTHによる皮質骨形成の促進を、特に骨膜領域を介する作用により誘導することが示された。

(4) 海綿骨のBFR及びMAR

海綿骨においては、PTH (−) 群のBFR (図4A) は $1.29 \pm 0.08 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MAR (図4B) は $3.61 \pm 0.19 \mu\text{m}/\text{day}$ であったのに対し、PTH (+) 群のBFRは $1.85 \pm 0.08 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ 、MARは $4.84 \pm 0.21 \mu\text{m}/\text{day}$ であった。PTH投与により、骨幹端海綿骨領域のBFR及びMARを有意 ($p < 0.05$) に増加させた (それぞれ約1.4倍及び約1.3倍)。

PTH (−) 群のBFR及びMARは、WTマウスとOPN-KOマウスとのあいだで差はなかった。しかしながら、PTH投与によるMAR及びBFRの増加率は、OPNの欠損により有意 ($p < 0.05$) に高まった (それぞれ約1.4倍及び約1.3倍)。

(5) 破骨細胞数

海綿骨の骨梁における単位骨梁周囲長当たりの破骨細胞数はPTH (−) 群は 5.4 ± 1.1 個/mmであったのに対し、PTH (+) 群は 9.2 ± 1.8 個/mmに増加し、その差は有意であった ($p < 0.05$) (図5)。

図5に示すように、WTマウスとOPN-KOマウスとのあいだで破骨細胞数に有意な差はなく、したがって両者のあいだで骨吸収が同程度に行われていることが示唆された。

(6) Dpyr尿中排泄

PTH (−) 群では $28.72 \pm 5.36 \text{ nM}/\text{mM Cr}$ であったのに対し、PTH (+) 群では $34.86 \pm 6.90 \text{ nM}/\text{mM Cr}$ であった。PTH投与により全身の骨再吸収は約1.2倍に増加し、その差は有意 ($p < 0.05$) であった (図6)。

PTH投与による尿中Dpyrレベルの変化は、WOマウスとOPN-KOマ

ウスとのあいだで差がなかった（図6）。これは、OPNを欠損させてもPTH投与により単位面積当たりの破骨細胞数に変化はないという上記知見を支持するものである。

5 産業上の利用の可能性

OPN作用の非存在下でPTHを投与すると、海綿骨骨量が増加するだけでなく、皮質骨の厚さや面積も有意に増加し、PTHによる骨形成の活性化を強化したことを示した。したがって、本発明の治療剤は、骨減少症の治療に有用である。

請 求 の 範 囲

1. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホル
モン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なく
5 とも1つの物質を含有する骨量減少症治療剤。
2. 該生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質が、オステオポンチ
ン遺伝子の発現を抑制する物質である請求項1に記載の骨量減少症治療剤。
- 10 3. 該生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質が、オステオポンチ
ンとその受容体との結合を阻害する物質である請求項1に記載の骨量減少症治療
剤。
4. オステオポンチンの該受容体が α v β 3インテグリンである請求項3に記
15 載の骨量減少症治療剤。
5. 骨量減少症が、骨粗鬆症によって引き起こされる疾患である請求項1から
4のいずれか1項に記載の骨量減少症治療剤。
- 20 6. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホル
モン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なく
とも1つの物質を含有する骨形成促進剤。
7. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホル
25 モン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なく
とも1つの物質を含有する皮質骨骨量増加剤。
8. （a）生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオス
テオポンチン阻害物質、（b）骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン（PT

H)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質、並びに(c)使用説明書、を含む骨量減少症治療用キット。

9. a) 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、(b) 骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質、並びに(c)使用説明書、を含む骨形成促進用キット。

10. a) 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、(b) 骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質、並びに(c)使用説明書、を含む皮質骨骨量増加用キット。

11. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、並びに骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を、それを必要とする患者に投与することを含む骨量減少症の治療方法。

12. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、並びに骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を、それを必要とする患者に投与することを含む骨形成の促進方法。

13. 生体内でのオステオポンチンの作用を阻害するのに有効な量のオステオポンチン阻害物質、並びに骨量の増加に有効な量の副甲状腺ホルモン(PTH)、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質を、それを必要とする患者に投与することを含む皮質骨骨量の増加方法。

14. 骨量減少症治療剤を製造するための、生体内でのオステオポンチンの作

用を阻害する物質、並びに副甲状腺ホルモン（PTH）、PTH誘導体及びPTH受容体アゴニストから選ばれる少なくとも1つの物質の使用。

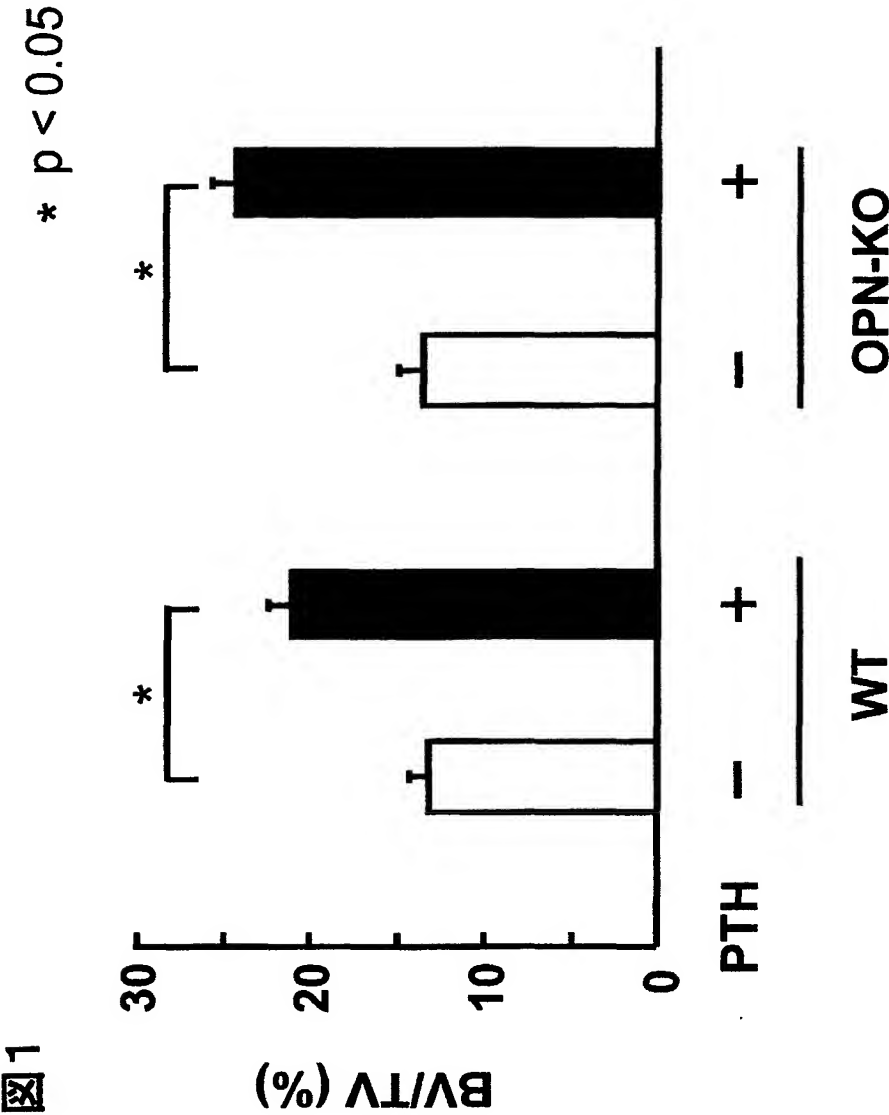
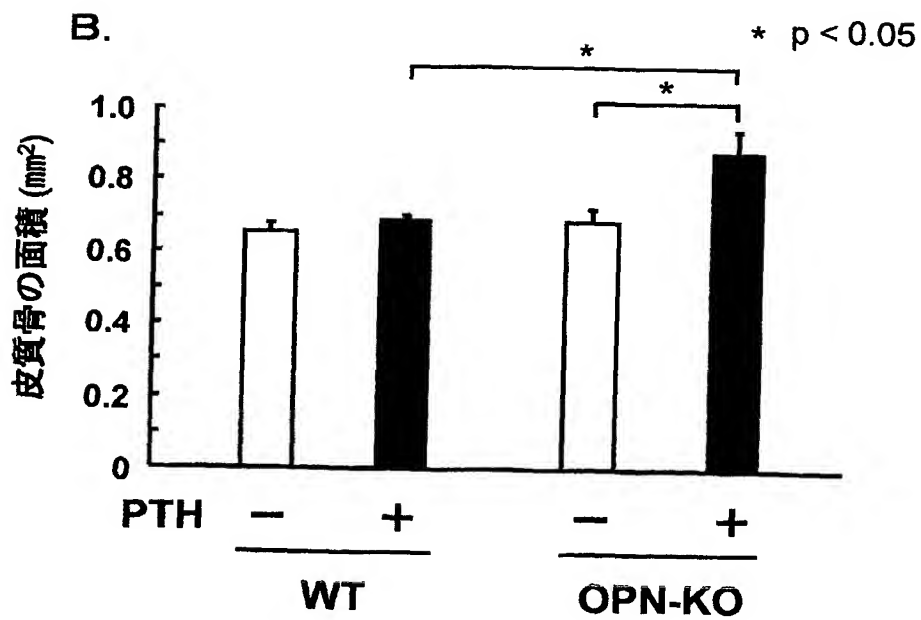
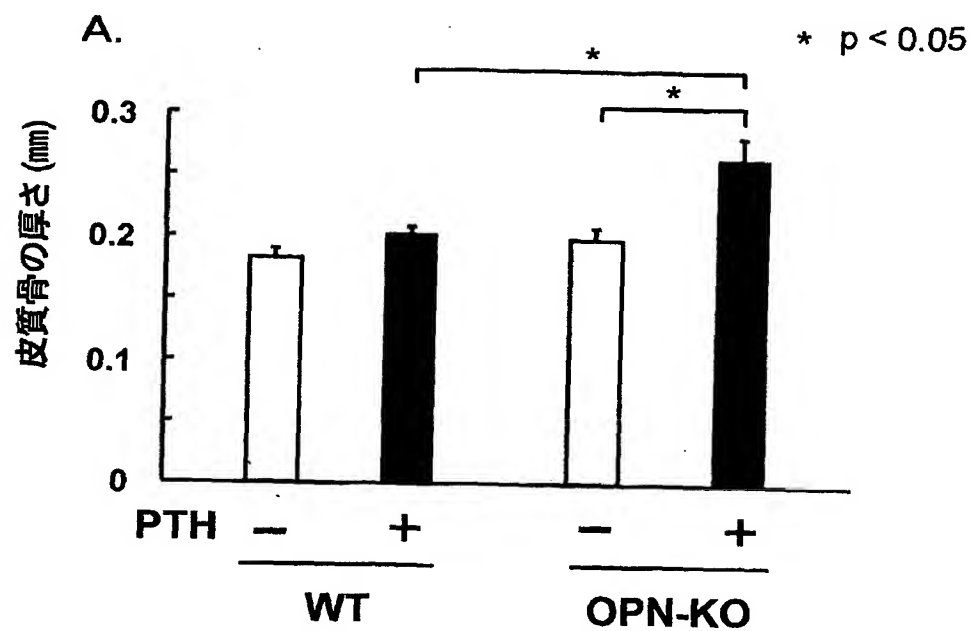


図2



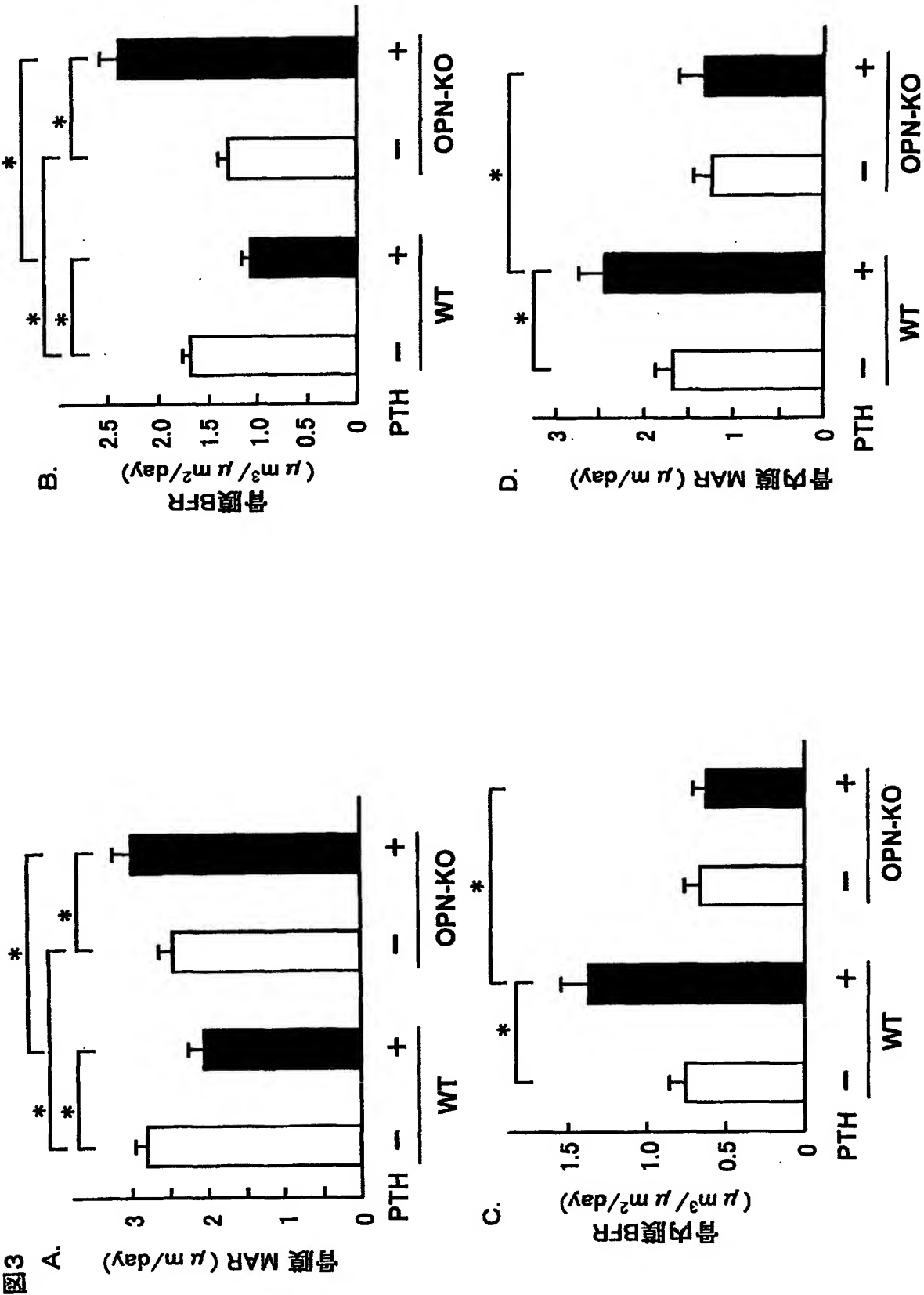
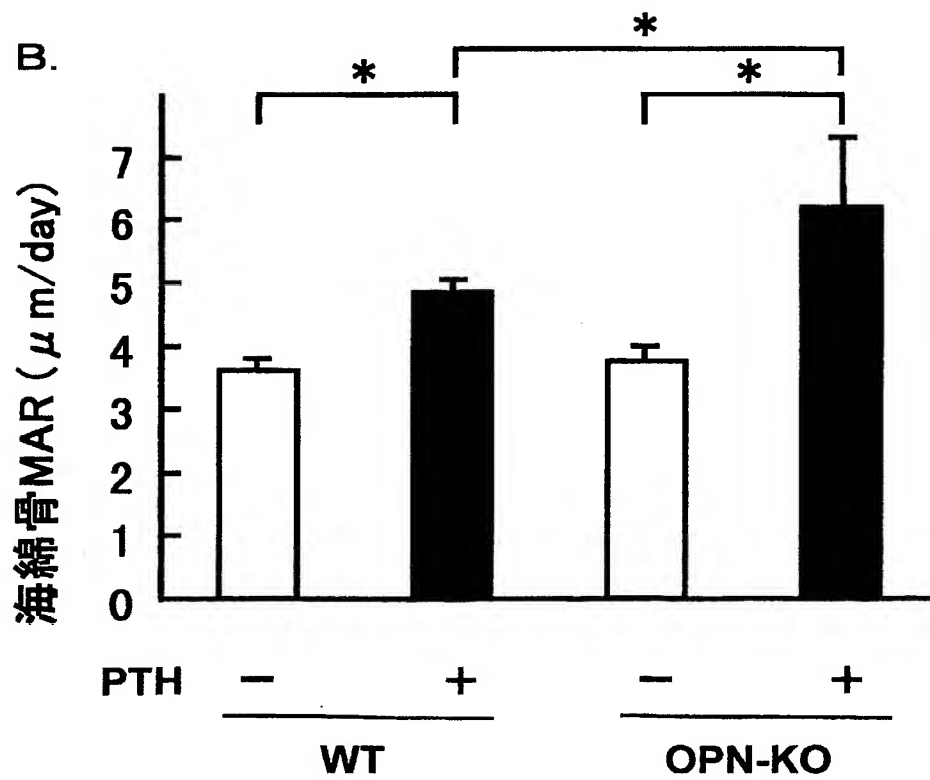
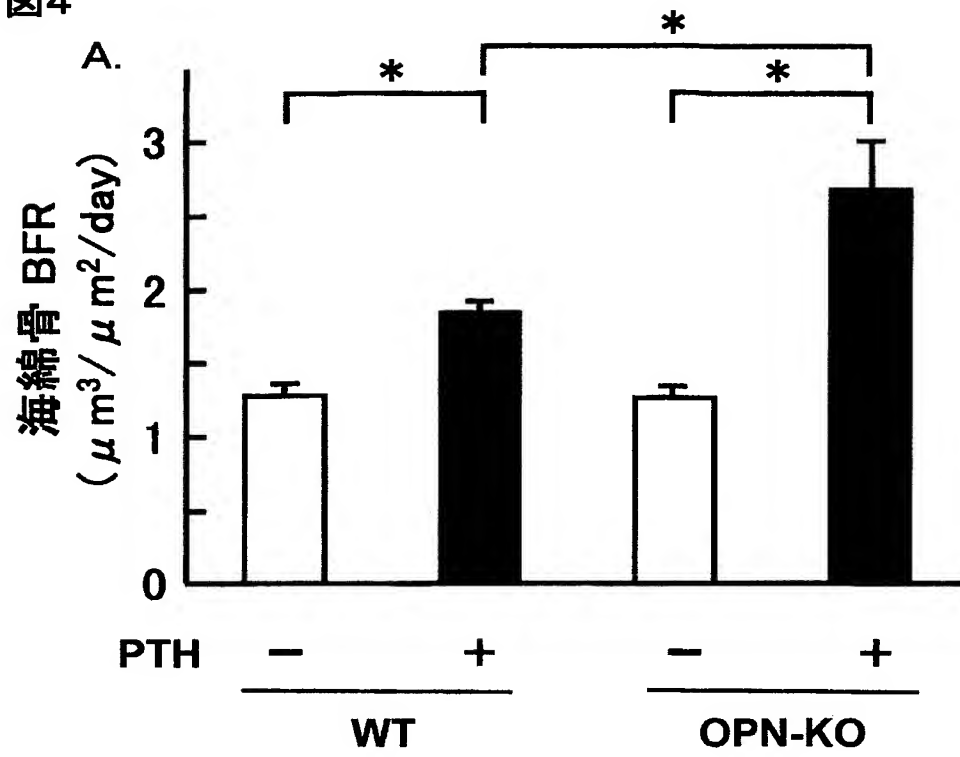
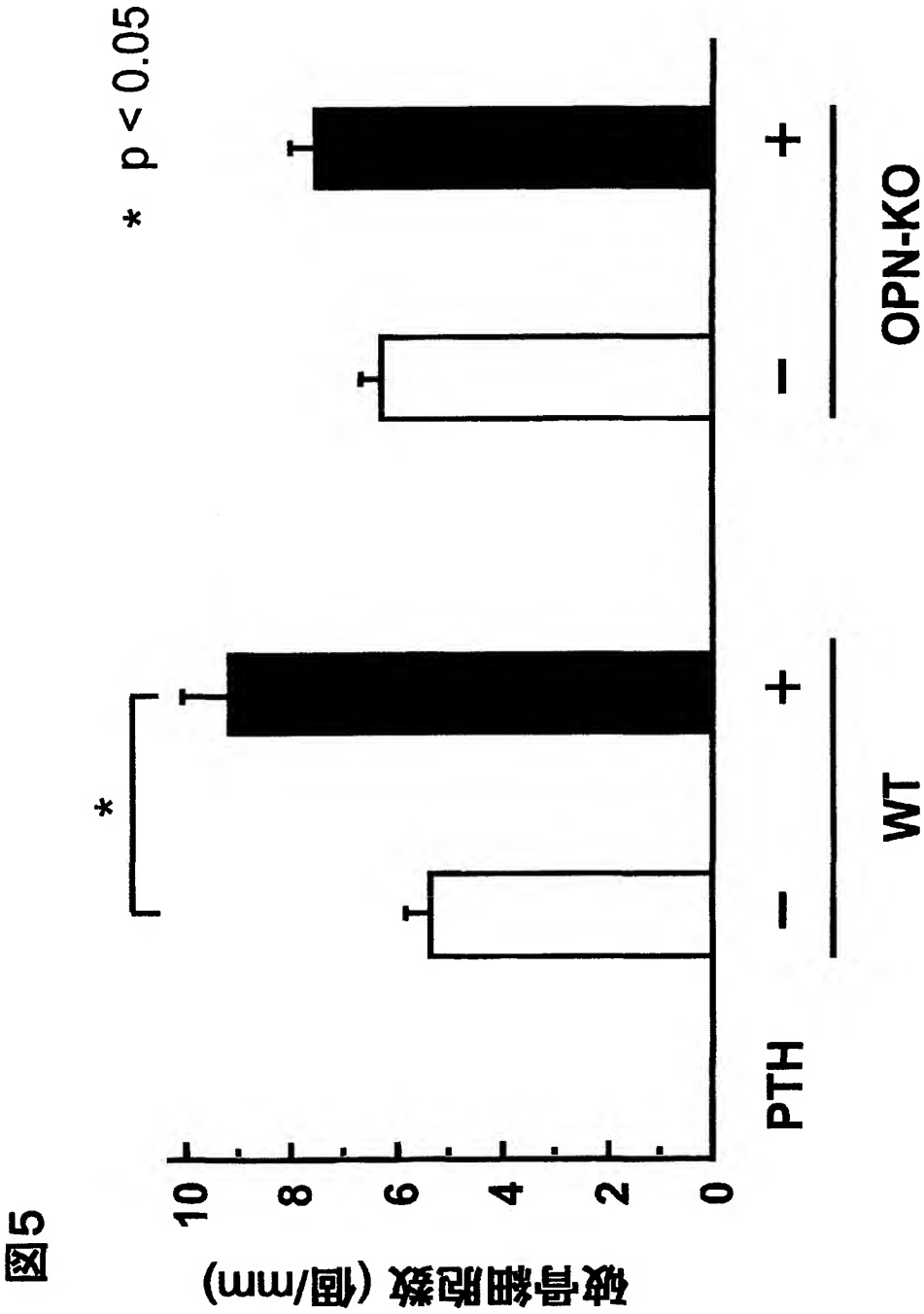
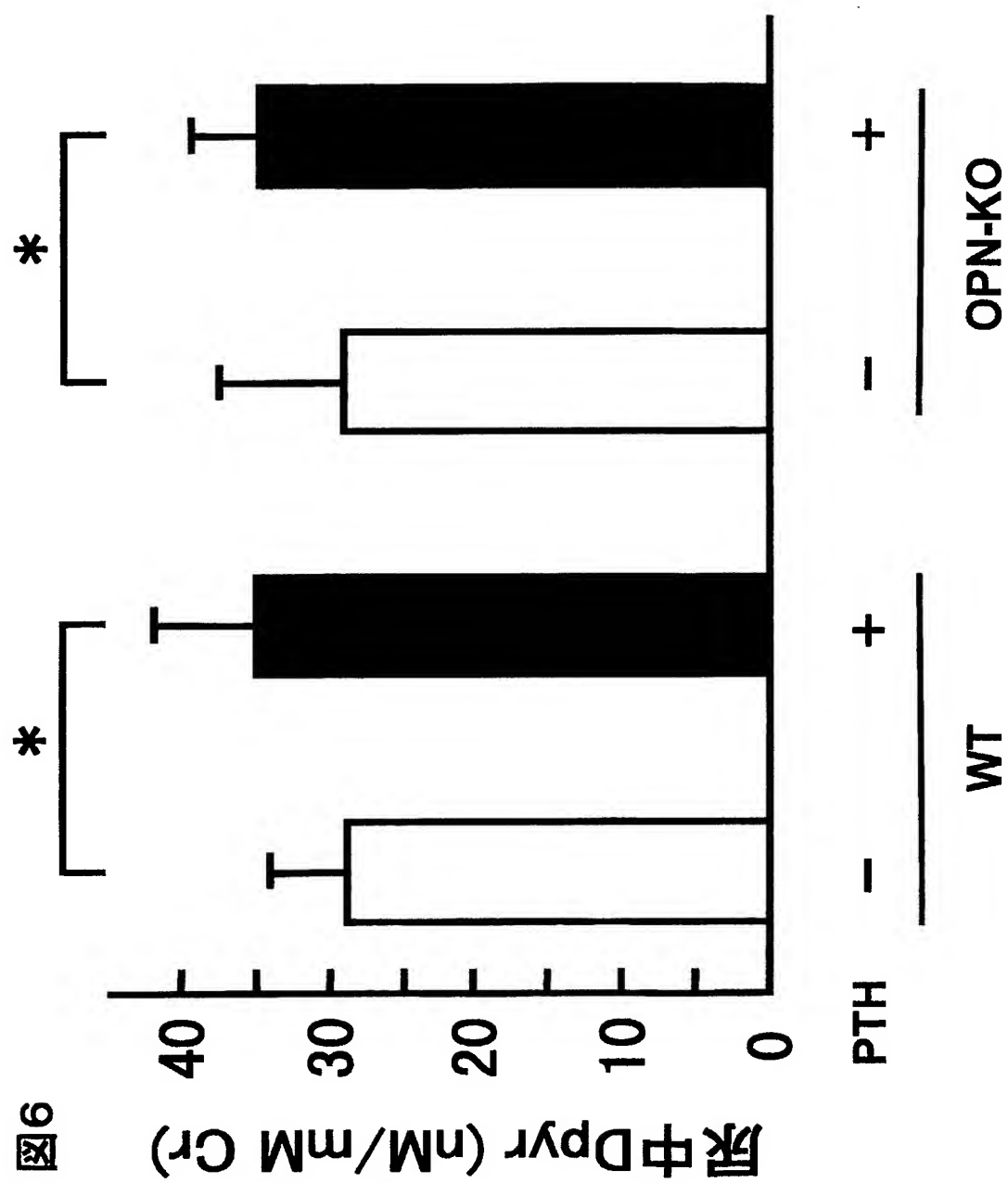


図4







INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/22, A61P19/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/22, A61P19/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IHARA, Hideyo et al., Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin., Journal of Biological Chemistry, 2001 April, Vol.276, No.16, pages 13065 to 13071, particularly, Abstract	1-10, 14
X	NODA, Masaki et al., Osteopontin deficiency suppresses parathyroid hormone-induced bone resorption., FASEB Journal, 2001 March, Vol.15, No.4, pages A189, 185.4	1-10, 14
X	KITAHARA, K. et al., Osteopontin-deficiency induces PTH-activation of cortical bone formation and enhances PTH-activation of cancellous bone formation in mice., Journal of Bone and Mineral Research, 2001 September, Vol.16, No.Suppl. 1, pages S142, 1023	1-10, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 December, 2002 (17.12.02)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09504

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHAPES, S.A. et al., Bone resorption is transiently suppressed during a calcium-deficient diet in mice lacking osteopontin., Journal of Bone and Mineral Research, 2000, Vol.15, No.Suppl. 1, pages S474., M068	1-10,14
X	IHARA, H. et al., Osteopontin-deficiency suppresses PTH/RANKL-induced bone resorption in organ cultures., Journal of Bone and Mineral Research, 2000, Vol.15, No.Suppl.1, pages S473., M067	1-10,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09504

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11 to 13 pertain to a method for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09504

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to make an international search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ¹ A61K45/00, 38/22, A61P19/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl ¹ A61K45/00, 38/22, A61P19/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	IHARA, Hideyo et al, Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin., Journal of Biological Chemistry, 2001 April, Vol.276, No.16, pp.13065-13071, 特に、Abstract	1-10, 14
X	NODA, Masaki et al, Osteopontin deficiency suppresses parathyroid hormone-induced bone resorption., FASEB Journal, 2001 March, Vol.15, No.4, pp. A189, 185.4	1-10, 14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	17.12.02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 深田 下 浩一 (印) 4C 9284 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KITAHARA, K. et al, Osteopontin-deficiency induces PTH-activation of cortical bone formation and enhances PTH-activation of cancellous bone formation in mice., Journal of Bone and Mineral Research, 2001 September, Vol.16, No.Suppl. 1, pp. S142, 1023	1-10, 14
X	SHAPES, S. A. et al, Bone resorption is transiently suppressed during a calcium-deficient diet in mice lacking osteopontin., Journal of Bone and Mineral Research, 2000, Vol.15, No. Suppl. 1, pp. S474., M068	1-10, 14
X	IHARA, H. et al, Osteopontin-deficiency suppresses PTH/RANKL-induced bone resorption in organ cultures., Journal of Bone and Mineral Research, 2000, Vol.15, No. Suppl. 1, pp. S473., M067	1-10, 14

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲11-13は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。